

**DIE BEEINFLUSSUNG DER
EXPERIMENTELLEN HÄMOGLOBIN-
OXIDATION IN HÄMOLYSATEN
AUS ERWACHSENEN- UND NABELSCHNURBLUT
DURCH 2,3-DIPHOSPHOGLYCERAT**

Barbara Ulmer

1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr.med. Klaus BETKE

DIE BEEINFLUSSUNG DER EXPERIMENTELLEN HÄMOGLOBIN-
OXIDATION IN HÄMOLYSATEN AUS ERWACHSENEN- UND NA-
BELSCHNURBLUT DURCH 2,3-DIPHOSPHOGLYCERAT

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilian-Universität zu München vorgelegt

von

Barbara Ulmer
aus Marbach/Neckar

München 1973



Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Referent: Prof. Dr. K. Betke

2. Referent:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.1974

<u>I n h a l t</u>	<u>Seite</u>
I. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
II. <u>Material, Methoden und Versuchsgänge</u>	4
1. Oxidation mit Kaliumferricyanid und Natriumnitrit	4
1.1 Material	4
1.2 Versuchsgang	5
1.3 Kinetik	7
1.4 Äußere Einflüsse	8
2. Spontane Methämoglobinbildung	10
2.1 Material	10
2.2 Versuchsgang	11
2.3 Äußere Einflüsse	
III. <u>Ergebnisse</u>	12
1. Oxidation durch Kaliumferricyanid	12
2. Oxidation durch Natriumnitrit	13
3. Spontane Methämoglobinbildung	14
IV. <u>Besprechung der Ergebnisse</u>	15
1. Oxidation durch Kaliumferricyanid	
2. und Natriumnitrit	15/19
3. Spontane Methämoglobinbildung	20
V. <u>Zusammenfassung</u>	22
VI. <u>Anhang</u>	24
Wertetabellen	24
Abbildungen	29
Literatur	36

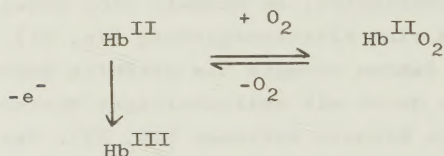
I. Einleitung und Fragestellung

Angeborene Methämoglobinämien sind relativ harmlose Krankheiten, die mit Methylenblau und Ascorbinsäure gut zu behandeln sind. Toxische Methämoglobinämien jedoch können je nach Menge des einwirkenden Gifts sehr gefährlich sein. So wurden Serien von Todesfällen durch sog. Brunnenwassermethämoglobinämien von Säuglingen beobachtet; es handelt sich dabei letzten Endes um eine Nitritvergiftung (10, 21). Bereits vor 100 Jahren erregte die gehäufte Erkrankung junger Säuglinge durch mit anilinhaltiger Wäsche-tinte gezeichnete Windeln Aufsehen (19, 27). Seitdem sind zahlreiche klinische und therapeutische Untersuchungen durchgeführt worden, die zu einer Klärung der Entstehung von Methämoglobin, seiner Beseitigung in der Zelle und dem den angeborenen Formen zugrundeliegenden Mechanismus geführt haben.

Methämoglobin (Hämiglobin, Ferrihämoglobin) ist nativer Blutfarbstoff, in dem das Eisen oxidiert ist, d.h. im dreiwertigen Zustand vorliegt. Dies schließt eine reversible Bindung von Sauerstoff aus. Methämoglobin ist also funktionell inaktiver Blutfarbstoff. Durch Reduktion des Häm-Eisens, die in der Zelle durch einen enzymatischen Mechanismus erfolgt, experimentell mit Reduktionsmitteln durchgeführt werden kann, wird Methämoglobin wieder zu Hämoglobin und damit funktionell aktionsfähig. Solange O_2 am Häm-Eisen gebunden ist, kann es nicht in den dreiwertigen Zustand übergehen. Methämoglobin kann nur aus Desoxyhämoglobin entstehen. Molekular gebundener Sauerstoff wirkt also als Oxidationsschutz;

in noch viel stärkerem Maß gilt das für CO, das ungefähr 200 mal fester gebunden wird.

Unter normalen atmosphärischen Bedingungen liegt das Gleichgewicht zwischen Sauerstoff-Assoziation und Sauerstoff-Dissoziation ganz auf seiten des Oxyhämoglobin:



Es ist schon lange bekannt (NEILL und HASTINGS, 1925) (17), daß eine Verminderung des O_2 -Druckes im experimentellen Ansatz die Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin fördert. Aber auch das Umgekehrte gilt: Erhöhung des O_2 -Druckes vermindert die Geschwindigkeit der experimentellen Oxidation (8). Damit erhebt sich die Frage, ob bei gleichbleibendem O_2 -Druck Maßnahmen, die die Dissoziation des O_2 vom Hb-Molekül fördern, ebenfalls die Oxidation beschleunigen.

Solche Bedingungen bestehen, wenn im Erythrozyten vermehrt 2,3-Diphosphoglycerat gebildet wird. Diese Substanz, ein Intermediärprodukt der Glykolyse, befindet sich im Erythrozyten schon unter normalen Bedingungen in hoher Konzentration. Sie wird unter hypoxämischen Bedingungen vermehrt gebildet, z.B. bei Höhenanpassung, Cyanose, Herzfehlern, Anämien und auch beim Neugeborenen in der unmittelbaren

Postnatalperiode (26).

Ich hatte die Aufgabe, einen solchen, zunächst hypothetischen Zusammenhang zwischen MetHb-Bildung und 2,3-diphosphoglyceratabhängiger O_2 -Affinität experimentell zu prüfen.

II. Material, Methoden und Versuchsgänge

1. Oxidation durch Kaliumferricyanid und Natriumnitrit

Eine einfache Möglichkeit, die Methämoglobin (MethHb)-Bildung zu prüfen, ist die von BETKE et al. (4, 5) beschriebene Methode der Oxidation mit Kaliumferricyanid ($K_3Fe(CN)_6$) oder mit Natriumnitrit ($NaNO_2$). In unserem Falle wurde sie auf Hämolysate aus Erwachsenen- und Nabelschnurblut mit und ohne Zusatz von 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) angewendet. Wir untersuchten damit, ob und wie 2,3-DPG die MethHb-Bildung beeinflusst.

1.1 Material

Die Hämolysate wurden gewonnen aus ACD-konserviertem Erwachsenenblut und aus mit Citrat versetztem Nabelschnurblut. 5 - 10 ml Blut wurden zuerst zweimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung, anschließend einmal mit 1,2%iger NaCl-Lösung gewaschen. Dann wurden die Erythrozyten mit soviel aqua dest. hämolysiert, daß sich ein Verdünnungsverhältnis von 1:50, d.h. eine Hb-Konzentration von ca. 600 mg/100 ml ergab.

Nach scharfer Zentrifugation von 20 min Dauer bei 5000 U/min wurde der völlig klare Überstand abgehoben und mindestens 12 Std. bei 4°C gegen aqua dest. dialysiert. Die Hb-Konzentration wurde nach BETKE und SAVELSBURG (7) an einer Probe über Cyanhämglobin bestimmt, und das Hämolysat durch Zugabe von 0,2M Triäthanolamin-Puffer (TRAP) von pH 7,0 auf eine Hb-Konzentration von 160 mg/100 ml eingestellt.

Das Hämolysat wurde geteilt. Der einen Hälfte wurden 50 Mikroliter einer 0,1M 2,3-DPG-Lösung pro ml zugesetzt, die andere wurde ohne Zusatz verwendet. Letztere wird in den Versuchsprotokollen als "ohne 2,3 -DPG", erstere als "mit 2,3-DPG" bezeichnet. Die Konzentration des Versuchsansatzes "mit 2,3-DPG" betrug $4,76 \times 10^{-3} \text{ M}$ 2,3-DPG. Sie entspricht der intraerythrozytären, denn 1 ml Erythrozyten enthalten $4,11 \times 10^{-6} \pm 0,76 \times 10^{-6} \text{ M}$ 2,3-DPG. Die Molarität im Erythrozyten beträgt $4,11 \times 10^{-3} \pm 0,76 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Die 0,1M 2,3-DPG-Lösung wurde aus Cyclohexylammonium-2,3-DPG (BOEHRINGER, Mannheim) und aqua bidest. hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt. Sie ist unter diesen Bedingungen 6 Monate haltbar.

Bei der Oxidation von Blutfarbstoff mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ verwendeten wir 5 mM und 2 mM Lösungen, die jeweils frisch aus einer 0,5M Stammlösung hergestellt wurden. Die Stammlösung enthielt 0,25% Na_2CO_3 . Sie wurde bei 4°C aufbewahrt und nach 3 Wochen erneuert.

Natriumnitrit wurde als 20 mM Lösung eingesetzt. Die Stammlösung war 0,25M. Sie entsprach sonst der $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Stammlösung.

1.2 Versuchsgang

Die MethHb-Bildung wurde mit einem Photometer Eppendorf bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Temperatur von 25°C bestimmt. Es wurde die Abnahme der

Extinktion bei 578 nm gemessen. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, hat hier Oxyhämoglobin mit seiner α -Bande ein hohes Maximum, während MetHb in diesem Bereich wesentlich weniger absorbiert. Die Umwandlung von Oxyhämoglobin zu MetHb bedingt also eine starke Extinktionsabnahme. Diese kann messend verfolgt werden; sie entspricht der Abnahme der Konzentration von Oxyhämoglobin und damit gleichlaufend der Zunahme der MetHb-Konzentration.

In den mit 1 ml Hämolysat gefüllten Küvetten wurde nach kurzem Vorlauf durch Zugabe und schnelles Durchmischen von 50 Mikrolitern $K_3Fe(CN)_6$ - bzw. $NaNO_2$ -Lösung die Reaktion gestartet. Im Falle der Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$ entstand eine fallende Exponentialkurve (Abb. 2), während bei der Oxidation mit $NaNO_2$ eine S-förmig gekrümmte fallende Kurve resultierte (Abb. 4).

Über einen Schreiber wurde der Ablauf der Reaktion registriert. Die Kurven wurden qualitativ und quantitativ ausgewertet.

Die Reaktionspartner wurden folgendermaßen dosiert: 1 ml einer 160 mg/100 ml Hb-Lösung + 0,05 ml einer 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung (bzw. 0,05 ml einer 2 mM $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung) ergaben zusammen 1,05 ml. Endgültige Konzentration für Hb:

$$152 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 2,37 \times 10^{-5} \text{ M} = 0,95 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Zugrundegelegt sind ein Molekulargewicht von 64 458 und 4 reaktionsfähige Häme pro Molekül.

Endgültige Konzentration für $K_3Fe(CN)_6$:

$$2,38 \times 10^{-4} M \quad \text{und} \quad 0,95 \times 10^{-4}.$$

Ein Molekül $K_3Fe(CN)_6$ kann eines der 4 Fe-Atome des Hb-Moleküls oxidieren, also ein Viertel des Hb-Moleküls. So ergibt sich bei den obigen Versuchsansätzen ein Verhältnis der Reaktionspartner von 1:2,5 und 1:1.

Für $NaNO_2$ gilt:

Hb-Lösung siehe oben.

0,05 ml 20 mM $NaNO_2$ zu 1 ml Hämolytat entsprechen $95 \times 10^{-5} M NaNO_2$.

Das Verhältnis $Hb/4:NaNO_2$ ist also ca. 1:10.

1.3 Kinetik

Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$

Es ist bekannt, daß diese Reaktion formal wie eine monomolekulare Reaktion abläuft (4), d.h. beim Auftragen des Logarithmus der noch vorhandenen Menge an HbO_2 gegen die Zeit eine fallende Gerade, bzw. des Quotienten C_0/C_t eine steigende Gerade entsteht (Abb. 6). Wir verzichteten jedoch auf die graphische Transformation der durch den Schreiber erhaltenen Kurve, sondern wählten der Einfachheit halber zur Beurteilung der Reaktionsgeschwindigkeit die Zeit, nach der die halbmaximale Extinktionsänderung erreicht war. Die Zeit wurde jeweils vom Einbringen des Oxidans an gemessen. Die Verzögerung von 0,5 - 1 sec durch den Mischvorgang wurde, da es sich um Vergleichsmessungen handelt, nicht berücksichtigt.

Oxidation mit NaNO_2

Die Reaktion stellte sich graphisch als S-Kurve dar, zu deren Beurteilung wir wieder die Halbwertszeit nahmen (Abb. 4).

1.4 Äußere Einflüsse

Puffer

Wie BETKE et al. (3, 4) gezeigt haben, ist die Oxidation von Hb stark vom pH-Wert abhängig. Verschiebung zum Säuren beschleunigt die Reaktion: eine pH-Wert-änderung von 6,88 auf 6,58 verkleinert die Halbwertszeit der Oxidation mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ auf die Hälfte.

Die pH-Schwankungen innerhalb der ersten Versuche, die mit TRIS-Puffer bei pH 7,0 gemacht worden waren, lagen bei 0,2 pH-Einheiten, wobei der Wert des DPG-freien Hämolyсата kleiner als der des DPG-haltigen war. 2,3-DPG ist in der benutzten Form alkalisch. Es hätte also sein können, daß durch diese pH-Verschiebungen ein DPG-Effekt vorgetäuscht oder verdeckt worden war.

Eine Erhöhung der Ionenstärke des Puffers hätte ebenfalls gestört, da hohe Ionenstärken eine dem DPG ähnliche Wirkung auf die Halbwertszeit haben.

Mit einem 0,2M TRA-Puffer pH 7,0 erreichten wir schließlich eine zufriedenstellende Konstanz von $\pm 0,01$. Die Messungen erfolgten mit einer Glaselektrode, die vor jeder Messung mit Standardpuffern

(pH = 6,84 und pH = 7,384) der Instrumentation Laboratory pH/Gas Analyzer 11 391 geeicht wurde.

Um den pH-Schwierigkeiten endgültig zu entgehen, entschlossen wir uns, das 2,3-DPG zu reinigen. 2,3-DPG liegt als Cyclohexylammonium (2,3-DPG-CHA) vor. Wir versuchten die stark basischen Ammoniumgruppen abzutrennen. Dazu füllten wir eine Säule mit dem Kationenaustauscher Dowex, beschickten sie mit 2,4 ml 0,1M 2,3-DPG-CHA und wuschen mit 21,6 ml aqua dest. nach. Das gereinigte 2,3-DPG hatte durch die Verdünnung die neue Molarität von 0,01, der Ph-Wert der freien Säure wurde mit 1N NaOH auf 6,8 eingestellt. Dazu wurden ca. 0,8 ml gebraucht, die wir in der neuen Molarität vernachlässigt haben.

MetHb-Konzentration

Nach BETKE et al. (4, 5) beeinflusst die bereits bei Reaktionsbeginn im Hämolyt vorhandene MetHb-Konzentration den Reaktionsablauf nicht, so daß wir sie nicht jedesmal kontrollierten. Die Werte lagen nach mehrfacher Prüfung um 1 - 3% MetHb.

Verdünnungseffekt

Durch die Zugabe der 0,05 ml $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung wurde der Küvetteninhalt um 5% verdünnt. $K_3Fe(CN)_6$ absorbiert bei 578 nm praktisch nicht. Die Ausgangsextinktion war nicht dem Vorlauf entsprechend, sondern um 5% geringer. Die als Halbwert abgegriffene Extinktion war um 2,5% zu hoch.

Eine rechnerische Prüfung des Einflusses dieser Verdünnung auf die Halbwertszeit ergab, daß der Fehler bei der Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$ 8% beträgt. Die eigentlichen Halbwertszeiten sind demnach um 8% länger. Da dieser Fehler konstant ist, und es in dieser Arbeit in erster Linie auf Vergleich der Halbwertszeiten, nicht aber auf ihren Absolutwert ankam, wurde die Korrektur der Wertetabellen und Abbildungen unterlassen. Für die Oxidation mit $NaNO_2$ wurde gleichermaßen verfahren.

2. Spontane MetHb-Bildung

2.1 Material

5 - 10 ml Frischblut Erwachsener und Nabelschnurblut wurden zweimal mit 0,9%iger NaCl, anschließend einmal mit 1,2%iger NaCl gewaschen. Aqua dest. wurde im Verhältnis 1:8 zugesetzt, das Hämolysat 20 min bei 5000 U/min zentrifugiert und mindestens 12 Std. bei 4°C gegen aqua dest. dialysiert. Die Alkalisierung des Dialysierwassers mit 0,02%igem Ammoniak hielt die MetHb-Bildung zurück, die in gereinigten Hämolysaten sonst leicht vonstatten geht. Vor und nach der Dialyse wurde der Gehalt an MetHb nach EVELYN und MALLOY (13) bestimmt und unverändert oder geringfügig erhöht gefunden (s.u.).

Für die Versuche wurden Hämolysate einer Konzentration von 1000 mg/100 ml verwendet, die 0,1M TRA-Puffer und 5 mM 2,3-DPG enthielten und einen pH-Wert von 6,8 hatten. Die Kontrollversuche wurden

mit DPG-freiem, sonst gleichem Hämolysat durchgeführt.

2.2 Versuchsgang

Je 4 ml dieser Lösungen wurden in Tonometern bei 37°C Atmosphärendruck und Sauerstoffkonzentrationen von 20, 15, 5 und 2% unter ständigem Schütteln inkubiert.

Bei diesen Konzentrationen und unseren experimentellen Bedingungen ist die O₂-Sättigung von HbA₁ laut Sauerstoffbindungskurve wie folgt:

Vol. %	Torr	O ₂ -Sättigung von HbA ₁
20	133	100
15	100	98
5	32	ca. 65
2	13	ca. 15

Nach 1, 2, 3 und 5 Stunden wurde der MetHb-Gehalt bestimmt. Hierzu wurden 0,15 ml Hämolysat in Küvetten mit 1,5 ml 0,2M Phosphatpuffer vom pH-Wert 6,64 einpipettiert und MetHb wie oben beschrieben bestimmt.

MetHb-Konzentration

Die Anfangswerte lagen zwischen 1,1 und 3,6% MetHb, wobei die Dialyse, wenn überhaupt, nur zu einer geringfügigen Erhöhung führte. In einer Erwachsenenblutkonserve wurde der auffallend hohe MetHb-Gehalt von 19,5 gefunden. Er störte den quantitativen Ablauf der Reaktion nicht.

III. Ergebnisse

1. Oxidation mit Kaliumferricyanid

Der Unterschied der Oxidationsgeschwindigkeiten in den Hämolysaten mit und ohne 2,3-DPG und zwischen Erwachsenen- und NabelschnurHb ist in Tab. 2 und 3 und Abb. 2, 3 und 5 dargestellt.

Die Versuche wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen des Oxidans durchgeführt, von dem sich ein Molekül mit $1/4$ Molekül Hb umsetzt. Wir setzten soviel $K_3Fe(CN)_6$ ein, daß sich in einem Fall ein Verhältnis $Hb/4:K_3Fe(CN)_6$ von 1:2,5, im zweiten Falle 1:1 ergab. Die Halbwertszeiten änderten sich dabei proportional. Die Oxidation ging also bei 2,5facher Konzentration des Oxidationsmittels 2,5 mal schneller vor sich. Dies gilt für Erwachsenen- und Nabelschnurblut (Tab. 1).

In Anwesenheit von 2,3-DPG lief die Oxidation schneller ab. Dieser Effekt war in Hämolysaten aus Erwachsenenblut größer als in denen aus Nabelschnurblut. So änderte sich bei einem Verhältnis $Hb/4:K_3Fe(CN)_6 = 1:1$ die mittlere Halbwertszeit von 91,5 sec auf 46,7 sec, bei einem Verhältnis von 1:2,5 von 36,9 auf 19,2 sec. Prozentual ausgedrückt ist das eine Verkürzung jeweils um 50%, d.h. Beschleunigung der Reaktion um 100%.

In den Hämolysaten aus Nabelschnurblut sank die mittlere Halbwertszeit bei $Hb/4:K_3Fe(CN)_6 = 1:1$ von 50,8 sec auf 33,0 sec, bei 1:2,5 von 20,8 sec auf 12,5 sec, also jeweils nur um 40%, was einer Beschleunigung um 67% entspricht. Hierbei muß bedacht werden, daß

Nabelschnur-Hb eine Mischung aus fetalem und adultem Hämoglobin darstellt, so daß die gefundene geringere Beschleunigung nicht für HbF allein angesetzt werden kann. Geht man vom üblichen Durchschnittswert von etwa $\frac{2}{3}$ HbF und $\frac{1}{3}$ HbA aus, dann läßt sich errechnen, daß die Halbwertszeit der Oxidation von reinem HbF nur um 51% beschleunigt wird, wenn man für den HbA-Anteil die experimentell dafür gefundenen Verhältnisse annimmt:

Die Reaktionszeit bei HbA wird um 100% beschleunigt. Die Reaktionszeit der Mischung aus $\frac{1}{3}$ HbA und $\frac{2}{3}$ HbF wird um 67% beschleunigt.

Es gilt also: $\frac{1}{3} \times 100\% + \frac{2}{3} \times X = 67\%$

$$X = 51\%$$

2. Oxidation mit NaNO_2

Bei diesen Versuchen, die in Abb. 4 und in Tab. 3 zusammengestellt sind, ergab sich ein anderes Bild.

Die DPG-Konzentration von $4,76 \times 10^{-3}$, die für die Oxidation mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ durchgehend benutzt worden war und die die Reaktion beschleunigt hatte, bewirkte jetzt eine Verlangsamung. Ohne 2,3-DPG wurde bei Erwachsenen-Hb eine Halbwertszeit von 2 min 37 sec, mit 2,3-DPG von 3 min 45 sec erreicht. Für Nabelschnurblut stellten sich die Halbwertszeiten auf 1 min 44 sec ohne und 2 min 24 sec mit 2,3-DPG ein.

Bei Veränderung der 2,3-DPG-Konzentration im Ansatz zeigte sich, daß mit wesentlich niedrigeren Konzentrationen möglicherweise eine Beschleunigung der

Reaktion eintrat. Dieser Effekt war jedoch nicht überzeugend.

Formal läßt sich die Oxidation mit NaNO_2 nicht mit der durch $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ vergleichen. Für die Halbwertszeit entscheidend ist bei NaNO_2 die Anlaufzeit, während bei $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ die MetHb-Bildung sofort einsetzt.

Eindeutig war die 1,5 mal schneller abgelaufene Reaktion bei Nabelschnurhämoglobin im Vergleich mit Erwachsenenhemoglobin, was den Verhältnissen bei der Oxidation mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ entspricht, und mit den früheren Ergebnissen von BETKE et al. (4, 5, 15) übereinstimmt.

3. Spontane MetHb-Bildung

Die Versuchsreihe begann mit einem Hämolysat aus Erwachsenenblut, das bei 37°C , Atmosphärendruck und 20% O_2 tonometriert wurde. Wie Tab. 4 zeigt, lief die Oxidation bei DPG-freiem und DPG-haltigem Hämolysat gleich schnell ab. Bei weiterem Senken der O_2 -Konzentration auf 15,5 und 2% konnte kein Unterschied zwischen DPG-freien und DPG-haltigen Hämolysaten festgestellt werden. Ebenso wenig unterschieden sich Erwachsenen- und Nabelschnurblut.

Deutlich zeigte sich jedoch der Einfluß der O_2 -Konzentration auf die Geschwindigkeit der Spontanoxidation überhaupt (Abb. 7 und Tab. 4). Die Abnahme der O_2 -Konzentration bewirkte zunächst eine Zunahme der MetHb-Bildung, dann eine Verlangsamung.

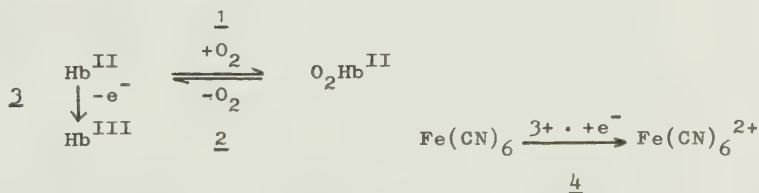
IV. Besprechung der Ergebnisse

1. Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$

Unsere Versuchsergebnisse lassen sich in 4 Punkten zusammenfassen:

1. Bestätigung der beschleunigten Oxidation von HbF gegenüber HbA
2. 2,3-DPG beschleunigt die Bildung von MetHb
3. 2,3-DPG hat auf die Oxidation von HbA zu MetHb einen stärker beschleunigenden Effekt als auf die Oxidation von HbF zu MetHb
4. Zunehmende $K_3Fe(CN)_6$ -Konzentration beschleunigt die Reaktion proportional (Reaktion 1. Ordnung)

In der Oxidation von Hb zu MetHb mit $K_3Fe(CN)_6$ sind 4 Teilvorgänge enthalten, die sich folgendermaßen darstellen lassen:



- 1 u. 2: Assoziation und Dissoziation von Sauerstoff. Bei normalen atmosphärischen Bedingungen liegt das Gleichgewicht auf seiten der Assoziation (Oxygenation).

3: Oxidation. Sie ist nur möglich, wenn das Eisen im Häm keinen molekularen Sauerstoff trägt.

4: Reduktion von Ferri- zu Ferrocyanid.

Was bei der Oxidation eigentlich geschieht, wird durch das obige Schema nur zusammenfassend quantitativ beschrieben. Über den Reaktionsablauf innerhalb des Hb-Moleküls ist damit noch nichts ausgesagt.

Das Hb-Molekül ist aus 4 Untereinheiten aufgebaut, die ihrerseits aus je einer Polypeptidkette bestehen, an die ein Pyrrolring mit einem Eisenatom, ein Häm, gebunden ist. Je zwei dieser Untereinheiten sind gleich und werden im HbA mit alpha 1 und 2, und beta 1 und 2 bezeichnet, im HbF wegen der unterschiedlichen Aminosäuresequenz mit alpha 1 und 2, gamma 1 und 2. Jede Polypeptidkette bildet eine Tasche um das jeweilige Häm. Die Taschen der beta-Ketten sind im reduzierten, liganden-freien Zustand so eng, daß außer dem Häm kein anderer Ligand mehr Platz hat. Eine Reaktion ist nur möglich, wenn sich erstens die Tasche erweitert und zweitens das Eisenatom seine Lage verändert. Beides ist bei den Reaktionen des Hb der Fall.

Die Erweiterung der Tasche ist die Folge einer Änderung in der Tertiärstruktur der betreffenden beta-Kette, indem sich eine Aminosäure aus der Tasche hinausdreht. Bei dem Eisenatom im Molekül drückt sich eine Änderung seines Energiezustandes in einer Änderung seiner Lage zum Porphyrinring aus. Es kann nämlich zwei Energiestufen einnehmen, den low spin state, stabil und energiearm wie im OxyHb,

und den high spin state, instabil und energiereich wie in der Desoxyform. Im low spin state liegt das Eisenatom in der Porphyrinebene, im high spin state liegt es außerhalb.

Da die Polypeptidketten durch van der Waals'sche Kräfte und Ionenbindungen untereinander verbunden sind, können solche Änderungen nicht isoliert geschehen. Wie über Hebel teilen sie sich dem übrigen Teil des Moleküls mit. Dies spielt eine besondere Rolle bei der Oxygenation in der sog. Häm-Häm-Wechselwirkung: sobald ein O_2 -Molekül aufgenommen ist, wird die Aufnahme der nachfolgenden erleichtert. Die Desoxyform des Hb hebt sich von den anderen Formen des Hb durch seine besondere Quartärstruktur ab. Wegen des high spin state des Eisenatoms stellt sie einen labilen, also reaktionsfreudigen Zustand dar.

Über die Oxidation zum MetHb kann bisher nur wenig gesagt werden. Man weiß, daß bei alkalischem pH ein Hydroxylion, bei neutralem und saurem pH ein Wassermolekül gebunden wird. Platz für den neuen Liganden wird dabei durch eine Erweiterung der Tasche in einer der beta-Ketten geschaffen. Das Eisenatom begibt sich in den low spin state. Über die Häm-Häm-Wechselwirkung bei der Oxidation reichen die Forschungsergebnisse zu einer Aussage noch nicht aus. Bisher sind lediglich teilloxidierte Komplexe nachgewiesen worden (19).

Wo und wie greift nun 2,3-DPG in den Reaktionsablauf ein?

Der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt ist

die Dissoziation von O_2Hb in O_2 und Hb , bzw. die Lage des Gleichgewichts. In reinen DesoxyHb-Lösungen läuft die MetHb-Bildung durch $K_3Fe(CN)_6$ schlagartig ab (4). BENESCH und BENESCH (2) fanden, daß 2,3-DPG das O_2Hb -Hb-Gleichgewicht auf die Seite von DesoxyHb verlagert. Daher war zu vermuten, daß auch die Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$ und anderen Oxidationsmitteln in Anwesenheit von 2,3-DPG schneller abläuft. Für $K_3Fe(CN)_6$ ließ sich die Vermutung in dieser Arbeit bestätigen.

Den Wirkungsmechanismus von 2,3-DPG auf das Hb-Molekül hat PERUTZ (19) mit Hilfe röntgen-spektrometrischer Untersuchungen aufgeklärt. Er fand, daß 2,3-DPG aufgrund seiner stereochemischen Struktur zwischen die beiden beta-Ketten paßt und dabei 4 zusätzliche Ionenbindungen einführt. Dadurch wird das Molekül fixiert, und die zur Oxygenation notwendigen Änderungen an Tertiär- und Quartärstruktur werden verhindert. Die Bevorzugung der beta-Ketten kann erklären, weshalb in unseren Versuchen 2,3-DPG auf HbA, bestehend aus zwei alpha- und zwei beta-Ketten, einen größeren Effekt hat, als auf HbF, das aus zwei alpha- und zwei gamma-Ketten aufgebaut ist. PERUTZ hat die Affinität von 2,3-DPG zu den verschiedenen Polypeptidketten gemessen. Er fand, daß der zur Halbsättigung notwendige O_2 -Partialdruck in HbA um den Faktor 2,1 zunahm, im HbF aber nur um den Faktor 1,2. Da die alpha-Ketten von 2,3-DPG nicht beeinflußt werden, heißt das, daß der 2,3-DPG-Effekt auf gamma-Ketten nur halb so groß ist wie auf beta-Ketten. Anders gesagt: 2,3-DPG

erhöht bei HbA die Dissoziationsgeschwindigkeit stärker als bei HbF. Wenn die O_2 -Dissoziation der für die Oxidation entscheidende Vorgang ist, müßte die Beschleunigung der Oxidation bei HbF geringer sein als bei HbA. Dies wurde gefunden.

2. Oxidation mit $NaNO_2$

Qualitativ ganz andere Vorgänge als beim $K_3Fe(CN)_6$ laufen bei der Oxidation mit $NaNO_2$ ab. Es handelt sich hierbei nicht um eine einfache Oxidation, sondern um eine gekoppelte. Gleichzeitig mit der Oxidation des Eisens wird Nitrit zu Nitrat oxidiert, wobei ein Teil des an O_2Hb gebundenen Sauerstoffs in die Reaktion eingeht (5, 15). Nach JUNG und REMMER (15) ist die Summenformel der Oxidation so anzunehmen:



Ob und in welcher Weise 2,3-DPG den Oxidationsvorgang beeinflußt, wagen wir nach unseren Ergebnissen nicht zu sagen. Nach unseren Daten kommt durch 2,3-DPG eher eine Verlangsamung zustande. Entscheidend für die Halbwertszeit ist die Anlaufzeit der Reaktion; danach geht sie in einem S-förmigen Verlauf autokatalytisch schnell zu Ende. Um den Effekt von 2,3-DPG interpretieren zu können, müßte man den Mechanismus der Oxidation durch $NaNO_2$, insbesondere die Hintergründe des autokatalytischen Ablaufs, besser kennen. Das ist bisher noch nicht gelungen. Man ist noch nicht über die bereits zitierten Untersuchungen von JUNG und REMMER (15) hinausgekommen.

3. Spontane MetHb-Bildung

Außerhalb des Zellverbandes wird Hämoglobin in Gegenwart von Luftsauerstoff langsam oxidiert. Der Erythrozyt besitzt einen an die Glykolyse gekoppelten enzymatischen Mechanismus, um dieser Tendenz zur Spontanoxidation ständig entgegenzuwirken. Deshalb sind normalerweise weniger als 1% MetHb im Blut vorhanden. Ist der Enzymmechanismus defekt, wie bei der enzymopenischen Form der angeborenen Methämoglobinämie, dann entstehen im Erythrozyten Prozentsätze bis 50% MetHb (3).

Es war von Interesse, nach dem eindeutig nachweisbaren Einfluß von 2,3-DPG auf die Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$ zu prüfen, ob die Spontanoxidation durch 2,3-DPG beschleunigt wird. Dies war nicht der Fall. Mit und ohne 2,3-DPG verlief die Spontanoxidation gleich schnell.

Die eigenen Untersuchungen bestätigten die bereits bekannte Tatsache (6), daß die spontane Oxidation zu MetHb in Erwachsenen- und Nabelschnurblut mit gleicher Geschwindigkeit abläuft. Hier ist der bei Benutzung von Oxidationsmitteln typische Unterschied von HbF und HbA nicht nachweisbar. Man muß daher annehmen, daß die Spontanoxidation von Hb zu MetHb ein qualitativ anderer Prozeß ist als die oben behandelten Oxidationen mit Oxidationsmitteln.

Obwohl 2,3-DPG keinen Effekt hatte, erwies sich die O_2 -Spannung im Tonometer als wichtiger Faktor für die Geschwindigkeit, mit der MetHb gebildet wurde. Es zeigte sich, daß mit sinkender Sauer-

stoffkonzentration die MetHb-Bildung zuerst zu- und dann abnimmt. Der "Grenzwert" lag zwischen 15 und 5% O_2 .

V. Zusammenfassung

Oxyhämoglobinlösungen aus Erwachsenen- und Nabelschnurblut mit und ohne 2,3-DPG wurden mit $K_3Fe(CN)_6$ oder $NaNO_2$ oxidiert, und die Geschwindigkeit des Vorgangs verglichen. Außerdem wurde die Spontanoxidation in Tonometern unter konstanten Bedingungen bei verschiedenen O_2 -Konzentrationen untersucht.

$K_3Fe(CN)_6$ oxidierte in Bestätigung älterer Angaben Nabelschnurblut doppelt so schnell wie Erwachsenen-Hb. Außerdem hatte eine 2,5fache Erhöhung des Oxidans einen 2,5 mal schnelleren Reaktionsablauf zur Folge. Zusatz von 5 mM 2,3-DPG beschleunigte die Oxidation in beiden Fällen, jedoch nicht gleichmäßig, sondern bei Erwachsenen-Hb auf das Doppelte, d.h. um 100%, bei Nabelschnur-Hb nur um 67%. Bezogen auf HbF würde sich daraus eine Beschleunigung von rund 50% errechnen.

Auch mit $NaNO_2$ wurde Nabelschnur-Hb annähernd doppelt so schnell oxidiert wie Erwachsenen-Hb. Zusatz von 2,3-DPG brachte keine Beschleunigung, sondern eher eine Verzögerung des Vorgangs bei beiden Hämoglobinen.

Erwachsenen- und Nabelschnur-Hb verhielten sich bei der Spontanoxidation gleich. 2,3-DPG hatte keinerlei Einfluß auf die Geschwindigkeit der MetHb-Bildung. Bestätigt wurde die alte Beobachtung, daß die Geschwindigkeit der MetHb-Bildung bei abnehmender O_2 -Konzentration bis zu einem Grenzwert zunimmt und dann wieder abfällt.

Das mit $K_3Fe(CN)_6$ erzielte Ergebnis entspricht der Erwartung, daß eine Erleichterung der Dissoziation von O_2 und Hb, wie sie durch 2,3-DPG bewirkt wird, die Oxidation des Hämoglobineisens begünstigt.

VI. Anhang: Wertetabellen

Tabelle 1:

Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$. Ein Molekül $K_3Fe(CN)_6$ setzt sich mit $1/4$ Molekül Hb um.

- A: $Hb/4:K_3Fe(CN)_6 = 1:1$
 B: $Hb/4:K_3Fe(CN)_6 = 1:2,5$
 I: Erwachsenenhämolysat ohne 2,3-DPG
 II: Erwachsenenhämolysat mit 2,3-DPG
 III: Nabelschnurhämolysat ohne 2,3-DPG
 IV: Nabelschnurhämolysat mit 2,3-DPG

Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Konzentration des Oxidans.

	I	II	III	IV
A	91,5s	46,7s	50,8s	33,0s
B	36,9s	19,2s	20,8s	12,5s

Tabelle 2:

Legende s. Tab. 1.

Halbwertszeiten in s der Oxidation von Hb zu MetHb
mit Mittelwert, S.D. und S.E.

A	I	II	III	IV
	76,8	46,8	52,8	33,0
	85,2	42,6	45,6	26,4
	106,8	51,0	67,2	32,4
	100,8	51,0	60,0	36,6
	99,6	49,2	51,0	34,2
	85,2	43,8	55,2	33,6
	92,4	47,4	51,6	30,0
	87,0	46,2	52,8	48,0
	99,6	46,2	57,0	32,4
	87,6	45,0	44,4	36,0
	98,4	47,4	46,2	28,2
	79,2	37,2	43,8	31,8
		43,8	48,6	30,6
		52,2	45,6	28,8
		52,2	40,8	
n	12	15	15	14
$\bar{x}$	91,55	46,73	50,84	35,0
S.D.	9,45	3,98	7,02	4,99
S.E.	2,73	0,31	1,81	1,29

Fortsetzung Tabelle 2:

B	I	II	III	IV
	34,8	21,6	18,6	10,2
	45,0	20,4	20,4	12,0
	35,4	18,0	19,2	11,4
	31,2	18,6	20,4	12,0
	36,0	19,2	22,2	13,2
	35,4	19,2	24,0	15,0
	36,6	18,6	21,0	15,0
	31,8	15,6	22,2	13,8
	50,4	16,2	22,8	13,8
	34,5	16,2	18,0	10,2
	34,8	22,8	19,8	11,4
		18,0	19,2	11,4
		22,8	19,2	11,4
		21,6	24,6	14,4
n	11	14	14	14
$\bar{x}$	36,9	19,2	20,83	12,51
S.D.	5,71	2,38	2,08	1,66
S.E.	1,72	0,64	0,55	0,44

Tabelle 3:

Halbwertszeiten und pH-Werte der Oxidation von Hb zu MetHb in Hämolysaten aus Erwachsenen- und Nabelschnurblut, ohne und mit verschiedenen Konzentrationen 2,3-DPG.

Verhältnis der Reaktionspartner $\text{Hb}/4:\text{NaNO}_2 = 1:10$.

Küvettenkonzentr. von 2,3-DPG	ErwachsenenHb		NabelschnurHb	
	pH	t/2 min	t/3 min	pH
0	7,04	2'37"	1'44"	6,99
$5 \times 10^{-7}\text{M}$	7,00	2'09"	1'34"	6,98
$5 \times 10^{-6}\text{M}$	7,00	2'10"	1'30"	6,98
$5 \times 10^{-5}\text{M}$	7,01	2'19"	1'35"	6,98
$5 \times 10^{-4}\text{M}$	7,00	2'52"	1'45"	7,00
$5 \times 10^{-3}\text{M}$	7,12	3'45"	2'24"	7,12

Tabelle 4:

Spontane MetHb-Bildung. MetHb-Konzentration in %
in Abhängigkeit von der Zeit in Std. und verschie-
denen Sauerstoffkonzentrationen abzüglich des MetHb-
Ausgangswertes.

1. Sauerstoffkonzentration 20% = 133 Torr
2. Sauerstoffkonzentration 15% = 100 Torr
3. Sauerstoffkonzentration 5% = 32 Torr
4. Sauerstoffkonzentration 2% = 13 Torr

Legende s.a. Tab. 1.

1.	I	II	III	IV
nach 1 Std.	4,2	6,6		
2	7,9	9,4		
3	9,5	13,7		
4	14,3	15,5		
5	17,2	19,2		
6	19,4	24,6		
2.				
nach 1 Std.	11,7	9,5		
2	17,8	16,7		
3	19,9	19,2		
6	34,0	29,5		
3.				
nach 1 Std.	2,2	2,0	1,9	0,9
2	6,0	5,1	3,4	3,8
3	10,0	8,2	8,2	8,8
6	20,2	16,3	27,3	19,4
4.				
nach 1 Std.	1,6	1,3	0,9	1,3
2	3,1	2,8	3,7	3,6
3	6,2	2,9	4,0	5,2
5	9,4	6,1	10,1	7,7

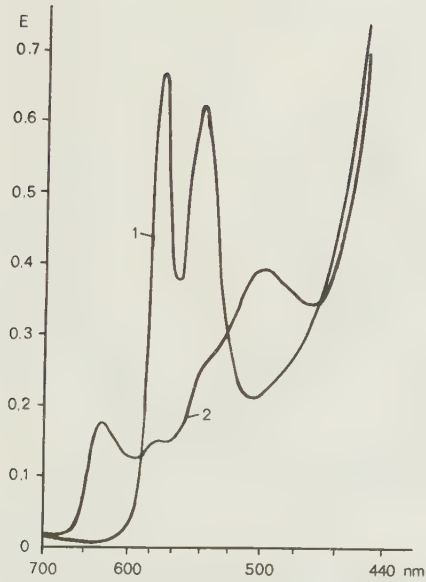


Abb. 1

Spektralkurven von menschlichem Blut-
farbstoff bei pH 6,8.

1 = Oxyhämoglobin

2 = Methämoglobin

(nach BETKE, 1968)

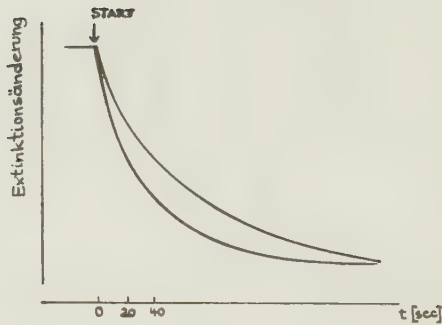


Abb. 2

Graphische Darstellung der Oxidation von Hb zu MetHb durch $K_3Fe(CN)_6$ in Hämolyat aus Erwachsenenblut.

Verhältnis der Reaktionspartner

$$Hb/4:K_3Fe(CN)_6 = 1:2,5$$

Rechts: Hämolyat ohne 2,3-DPG

Links: Hämolyat mit 2,3-DPG

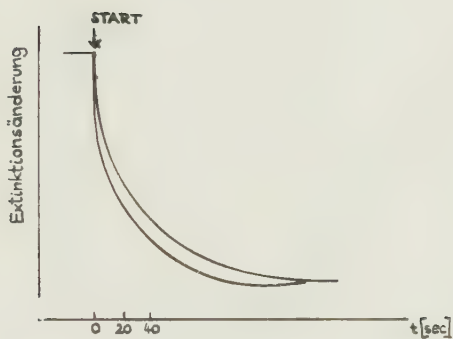


Abb. 3

Graphische Darstellung der Oxidation
von Hb zu MetHb durch $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in
Hämolysat aus Nabelschnurblut.

Verhältnis der Reaktionspartner

$$\text{Hb}/4:\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 = 1:2,5$$

Rechts: Hämolysat ohne 2,3-DPG

Links: Hämolysat mit 2,3-DPG

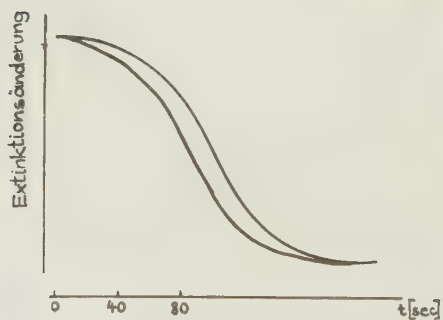


Abb. 4

Graphische Darstellung der Oxidation
von Hb zu MetHb durch NaNO_2 in
Hämolysat aus Nabelschnurblut.

Verhältnis der Reaktionspartner

$\text{Hb}/4:\text{NaNO}_2 = 1:10$

Rechts: Hämolysat ohne 2,3-DPG

Links: Hämolysat mit 2,3-DPG

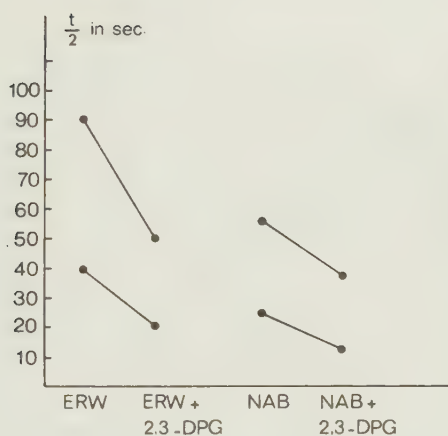


Abb. 5

Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$.

Änderung der mittleren Halbwertszeit in Hämolysaten aus Erwachsenen- und Nabelschnurblut mit und ohne 2,3-DPG.

Die beiden oberen Geraden entsprechen einem Verhältnis der Reaktionspartner von 1:1, die unteren von 1:2,5.

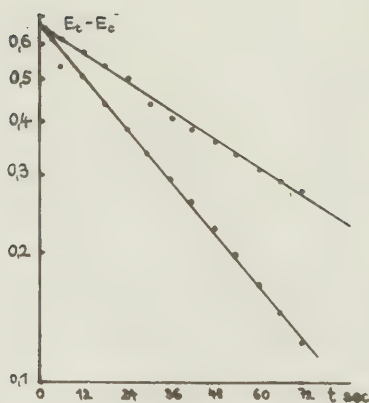


Abb. 6

Halblogarithmische Darstellung der
Oxidation von Hb zu MetHb durch
 $K_3Fe(CN)_6$ in Hämolysat aus Erwach-
senenblut. Aufgetragen sind die
Differenzen E_t (Extinktion zur Zeit t)
minus E_e (Extinktionsendwert).
Obere Gerade: Hämolysat ohne 2,3-DPG
Untere Gerade: Hämolysat mit 2,3-DPG

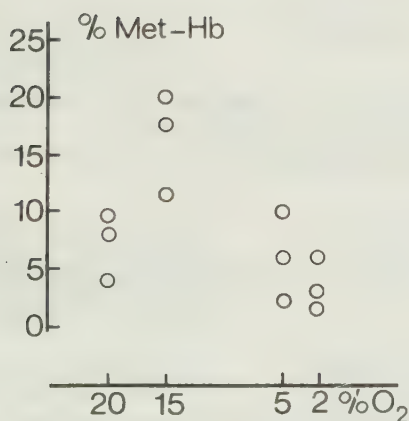


Abb. 7

Graphische Darstellung der spontanen
Oxidation von ErwachsenenHb zu MetHb bei
Sauerstoffkonzentrationen von 20, 15, 5
und 2%. Aufgetragen sind die Werte
nach 1 Std. (unterster Punkt)
2 Std. (mittlerer Punkt)
3 Std. (oberster Punkt)

VII. Literatur

- (1) Bauer, Ch., Ludwig, M. Resp. Physiol. 7(1967)
Ludwig, I.: 271-277
Factors governing the oxygen affinity of human
adult and fetal blood.
- (2) Benesch, R., Benesch, R.E.: Biochem. Biophys. Res.
Comm. 26(1967)162-167
The effect of organic phosphates on the oxygen
equilibrium of human erythrocytes.
From the human erythrocytes on the allosteric
properties of hemoglobin.
- (3) Betke, K.: Der menschliche rote Blut-
farbstoff. Berlin-
Göttingen-Heidelberg.
Springer(1954)
- (4) Betke, K., Greinacher, I. Arch. exper. Path. u.
u. Hecker, F.: Pharmakol. 229(1956)207-209
Oxidation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine
durch Kaliumferricyanid.
- (5) Betke, K., Greinacher, I. Arch. exper. Path. u.
u. Tietze, O.: Pharmakol. 229(1956)220-232
Oxidation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobi ne
durch Natriumnitrit.
- (6) Betke, K., Kleihauer, E. Zeitschrift für Kinderhik.
u. Lipps, M.: 77(1956)549-553
Vergleichende Untersuchungen über die Spontanoxidation
von Nabelschnur- und Erwachsenen-hämoglobin.
- (7) Betke, K., Savelsberg, W.: Biochem. Z. 320(1950)431
Stufenphotometrische Hb-Bestimmung mittels Cyan-
hämoglobin.

- (8) Betke, K., Scholz, P.: Naturwissensch. 45(1958)88
Vergleichende Untersuchung der Oxidation von Oxy-
hämoglobin Neugeborener und Erwachsener durch Kalium-
ferricyanid bei verschiedenen Sauerstoffspannungen.
- (9) Evelyn, K.A., Malloy, H.T.: J. Biol. Chem. 126(1938)655
Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin,
and sulfhemoglobin in single samples of blood.
- (10) Finch, C.A.: New England J. of Med. 239(1948)470
Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia.
- (11) Itano, H.A., Robinson, E.: J. of Am. Chem. Soc. 78(1956)6415
Demonstration of intermediate forms of carbomonoxy-
and ferrihemoglobin by moving boundary electro-
phoresis.
- (12) Jung, F. u. Remmer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 206(1949)459
Über die Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin.
- (13) Martin, H., Huisman, T. H. J.: Nature 200(1963)898-899
Formation of ferrihemoglobin of isolated human
hemoglobin types by sodium nitrite.
- (14) Neill, J. M., Hastings, A. B.: J. of Biol. Chem. 63(1925)479-492
The influence of the tension of molecular oxygen
upon certain oxidations of hemoglobin.
- (15) Perutz, M. F.: Nature 228(1970)726-739
Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin.
- (16) Rayner: Veröffentlichung 1886
Zit. nach Walliker & Baxter

- (17) de Verdier, C.H., Garby, L.: Försvarsmedicine
3(1969)192-194
Binding of 2,3-DPG to hemoglobin F and its
physiological significance.
- (18) de Verdier, C.H., Garby, L.: Scand.Clin.Lab.Invest.
23(1963)149-151
Low binding of DPG to hemoglobin F.
- (19) de Verdier, C.H., Hjelm, M.: Försvarsmedicine
5(1969)258-259
The role of 2,3-DPG in the erythrocyte as a
regulator of tissue oxygen tension.
- (20) Versmold, H., Seifert, G., Respir.Physiol.18
Riegel, K.: (1973)14-75
Blood oxygen affinity in infancy: The inter-
action of fetal and adult hemoglobin, oxygen
capacity, red cell hydrogen ion and 2,3-DPG
concentration.
- (21) Walliker, G.W., Baxter, F.H.: Arch.of Pediatr.
66(1949)143
Methemoglobinemia the cause of cyanosis in infants and children.

Herrn Prof. Dr. K. B e t k e bin ich für die
Überlassung des Themas zu Dank verpflichtet.

Herr Dr. H. V e r s m o l d und
Fräulein H. W i n d t h o r s t unterstützten
mich bei der Lösung experimenteller Probleme.

Die II. Frauenklinik der Universität München
stellte mir das Nabelschnurblut zur Verfügung.

Lebenslauf

30. 8. 1948	geboren in Hoheneck/Neckar
Juni 1967	Reifeprüfung in Ludwigsburg
Oktober 1967	Beginn des Medizinstudiums an der FU Berlin
September 1968	Vorphysikum in Berlin Fortsetzung des Studiums an der Universität München
März 1970	Physikum in München
Oktober 1970	Studienjahr an der Universität Lausanne
26. 6. 1973	Staatsexamen in München

